

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07196694 A**(43) Date of publication of application: **01.08.95**

(51) Int. Cl.

C07K 14/52**C07K 16/24****C12N 5/10****C12N 15/02****C12N 15/09****C12P 21/02****C12P 21/08****G01N 33/53****G01N 33/577****// A61K 39/395****(C12P 21/02 , C12R 1:91), (C12P 21/08 , C12R 1:91)**(21) Application number: **06274305**(22) Date of filing: **14.10.94**(30) Priority: **15.10.93 JP 05281622**(71) Applicant: **HIRANO TOSHIO**(72) Inventor: **HIRANO TOSHIO
KAISEI TSUNEYASU****(54) MEMBRANE PROTEIN POLYPEPTIDE HAVING
PRE-B CELL PROLIFERATION-SUPPORTING
ABILITY AND GENE THEREOF**screening this library is incorporated into a
manifestation vector and then manifested in host cells.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new membrane protein polypeptide derived from the synovial cells of patients with chronic arthrorheumatism, promoting the pre-B cell proliferation-supporting ability on said patients' synovial cells, thus enabling chronic arthrorheumatism to be identified and the clinical diagnostics therefor to be developed.

CONSTITUTION: This polypeptide is derived from the synovial cells of patients with chronic arthrorheumatism, has a sequence of 180 amino acids or part thereof, and promotes the pre-B cell proliferation supporting ability on the synovial cells of said patients; therefore, being useful for identifying chronic arthrorheumatism and for the clinical diagnostics therefor. This polypeptide can be obtained by the following processes: the whole RNA separated from the synovial cell line derived from patients with chronic arthrorheumatism is treated with oligo d(T) cellulose to isolate mRNA, and a cDNA is synthesized using this mRNA as template, and a cDNA library is made by conventional method, and a DNA obtained by

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
      5              10              15
Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
      20              25              30
      .
      .
      .
      .
Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
      165              170              175
Ala Leu Leu Gln

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196694

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/52		8318-4H		
16/24		8318-4H		
C 1 2 N 5/10		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-274305

(22) 出願日 平成6年(1994)10月14日

(31) 優先権主張番号 特願平5-281622

(32) 優先日 平5(1993)10月15日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 591264038

平野 俊夫

大阪府大阪市住之江区安立2-7-6

(72) 発明者 平野 俊夫

大阪府大阪市住之江区安立2丁目7番6号

(72) 発明者 改正 恒康

兵庫県西宮市神楽町6丁目19番304号

(74) 代理人 弁理士 須藤 政彦

(54) 【発明の名称】 プレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクポリペプチド及びその遺伝子

(57) 【要約】

【構成】 プレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチドをコードする遺伝子、及び180個のアミノ酸配列又はその一部を有するプレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチド。該遺伝子を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を作製し、該形質転換体を培養することからなる該新規膜タンパクポリペプチドの製造方法。該新規膜タンパクポリペプチドを認識するモノクローナル抗体。

【効果】 上記遺伝子は、プレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクをコードする。均一な新規膜タンパクポリペプチドを大量に製造することが可能であり、更には、該ポリペプチドを認識するモノクローナル抗体を製造することが可能であり、慢性関節リウマチ(RA)の同定及びこれらの臨床上の診断用試薬の作製が可能である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号2に示す塩基配列、又はこれを一部置換、欠除もしくは付加した塩基配列にハイブリダイズする塩基配列を有する請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 請求項2～3のいずれか1項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えベクターにより形質転換された原核又は真核宿主細胞。

【請求項6】 請求項5に記載の宿主細胞を培養することを特徴とする配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドの製造方法。

【請求項7】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドを認識するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子、及び該遺伝子によってコードされる新規膜タンパクに関し、更に詳しくは、ブレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターによる形質転換体、及び該遺伝子を用いた新規膜タンパクポリペプチドの製造方法に関する。本発明は、更にブレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチドを認識するモノクローナル抗体に関する。

【0002】本発明の遺伝子は、慢性関節リウマチ（RA）患者の滑膜細胞上のブレB細胞増殖支持能を亢進する新規膜タンパクをコードする。本発明の遺伝子を適当なベクターに挿入した後、常用の宿主細胞を形質転換することにより、大量に均一なブレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチドを製造することが可能となる。このことから、本発明により、慢性関節リウマチ（RA）の同定及びこれらの臨床上の診断用試薬の作製が可能となる。

【0003】

【従来の技術】慢性関節リウマチ（RA）患者の滑膜や滑膜液中の炎症細胞は末梢血由来であり、これらの細胞の滑膜等への移行については完全に解明されていないが、細胞に与えられる化学シグナルと細胞膜上のタンパク（接着分子）との複雑な相互作用が関与していると考えられている。

【0004】関節炎におけるこれ等膜タンパクの重要性については種々研究されている。例えば、慢性関節リウマチ（RA）患者の滑膜内層上や滑膜血管上にはT細胞

2

表面分子LFA-1のリガンドであり、血管壁における細胞の接着や遊出の両方に関与している細胞間接着分子-1（以下ICAM-1）が発現していることが知られている〔Hale等；Arthritis Rheum., 32:22（1989）、及びHaynes等；Springer Semin. Immunopathol., 11:163（1989）〕。

【0005】同様にTリンパ球（特に記憶細胞）や単球上に発現しているインテグリンVLA-4のリガンドである血管細胞接着分子-1（以下VCAM-1）が慢性関節リウマチ（RA）や変性関節炎等の滑膜や線維芽細胞様滑膜細胞上に発現していること〔Morales-Ducet等；J. Immunol., 149:1424（1992）〕、更にはVAP-1と呼ばれる膜タンパクが滑膜の高内皮性小静脈に発現しており、このタンパクは白血球の特異的認識構造として働いている可能性が示唆されている〔Salmi等；Science, 257, 1407（1992）〕。

【0006】本発明者は、B細胞の機能異常をきたす疾患における骨髓微小環境の病的意義を明らかにすることを目的に研究を進め、慢性関節リウマチ（RA）患者及び多発性骨髓腫（MM）患者では、正常人と比較して、骨髓由来ストローマ細胞のブレB細胞増殖支持能が亢進していること、及びこの支持能には、ブレB細胞とストローマ細胞との直接接触が必須である等の知見を得たことから、各々の患者のストローマ細胞をセルライン化し、ブレB細胞の増殖を促進する因子を有するストローマ細胞株（RASV5-5, MMSV3-3）を樹立したところ、これらストローマ細胞株によるブレB細胞の増殖支持には、既知のStem cell factor（SCF）、ICAM-1、CD44、VCAM-1、LFA-1 α 、LFA-1 β 、NCAM、ELAM-1とは別の未知の接着因子が関与していることを見出した〔J. Immunol., 149:4088（1992）〕。

【0007】更には、慢性関節リウマチ（RA）患者の滑膜細胞をセルライン化した滑膜細胞株SynSV6-14も、慢性関節リウマチ（RA）患者の骨髓由来ストローマ細胞株RASV5-5と同様に、ブレB細胞増殖支持能を有していることが示唆されたことから、これ等の細胞株に反応し、ブレB細胞増殖支持能を持たないヒト骨髓由来ストローマ細胞株NFSV1-1には反応しない新規モノクローナル抗体を得るとともに、その抗原膜タンパク（Bs1-1）をコードする遺伝子のクローニングにも成功した（特願平5-141178号）。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】一方、本発明者は、慢性関節リウマチ（RA）患者由来滑膜細胞に発現しているが、正常由来細胞には発現していない膜タンパクを認識する種々のマウスモノクローナル抗体の作製の過程

で、SynSV6-14と反応するが、正常骨髄間質細胞株NF SV1-1とは反応しない性質を有し、前述のBst-1とは異なる膜タンパクを認識する新規マウスモノクローナル抗体RS38を得た。次いで、更に、このRS38抗体を用いて慢性関節リウマチ(RA)患者滑膜細胞株より作製されたcDNAライブラリーをスクリーニングし、該RS38と反応する新規膜タンパクをコードするクローンを単離することに成功し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、プレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターによる形質転換体、及び該遺伝子を用いた新規膜タンパクの製造方法を提供することを目的とするものである。

【0010】更には、本発明は、プレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクを認識するモノクローナル抗体の提供も目的の一つとするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するための本発明は、以下の(1)～(7)からなる。

(1) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するリウマチ患者滑膜上に発現する新規膜タンパクポリペプチド。

【0012】(2) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドをコードするDNA。

【0013】(3) 配列表の配列番号2に示す塩基配列、又はこれを一部置換、欠除もしくは付加した塩基配列にハイブリダイズする塩基配列を有する前記(2)記載のDNA。

【0014】(4) 前記(2)～(3)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。

【0015】(5) 前記(4)に記載の組換えベクターにより形質転換された原核又は真核宿主細胞。

【0016】(6) 前記(5)に記載の宿主細胞を培養することを特徴とする配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドの製造方法。

【0017】(7) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列又はその一部を有するポリペプチドを認識するモノクローナル抗体。

【0018】続いて、本発明について詳細に説明する。

【0019】本発明のモノクローナル抗体は、基本的には、次のようにして作製することができる。すなわち、本発明の抗体は、プレB細胞増殖支持能を有する慢性関節リウマチ(RA)患者由来滑膜細胞を感作抗原として使用して、通常の免疫法に従って免疫し、通常の細胞融合法に準じて細胞融合させ、通常のクローン化法に準じてクローン化することによって作製することができる。

【0020】本発明のモノクローナル抗体の作製方法

は、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、培養細胞として樹立されている慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜由来細胞株SynSV6-14を使用し、該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞(免疫細胞)を、マウス等の哺乳動物のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞(ハイブリドーマ)をクローン化し、その中からSynSV6-14を認識する本発明の抗体を産生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好ましく例示される。

【0021】前記モノクローナル抗体の作製方法において、感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

【0022】免疫は、一般的方法により、例えば、前記慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜由来細胞株SynSV6-14の培養細胞を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することにより行われる。より具体的には、PBSや生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバンドを併用して、動物に4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、前記投与に際しては通常の担体(シュレッパー)を採用することもできる。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

【0023】前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3(P3X63Ag8.653)[J. Immunol., 123:1548(1978)]、p3-U1[Current Topics in Micro-biology and Immunology, 81:1-7(1978)]、NS-1[Eur. J. Immunol., 6:511-519(1976)]、MPC-11[Cell, 8:405-415(1976)]、SP2/0[Nature, 276:269-270(1978)]、FO[J. Immunol. Meth., 35:1-21(1980)]、S194[J. Exp. Med., 148:313-323(1978)]、R210[Nature, 277:131-133(1979)]等が好適に使用される。

【0024】前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、例えば、ミルシュタインら(Milstein et al.)の方法[Methods Enzymol., 73:3-46(1981)]等に準じて行うことができる。

【0025】より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用

され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して、免疫細胞を1~10倍程度とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することも可能である。

【0026】細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000~6,000程度のPEGを、通常、培地に約30~60%(W/V)の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドマが形成される。

【0027】該ハイブリドマは、通常、選択培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養することにより選択される。該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドマ以外の細胞(未融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間継続する。次いで、通常、限界希釈法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドマのスクリーニング及び単一クローン化が実施される。

【0028】このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドマは、通常、培地で継代培養することが可能であり、また液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0029】該ハイブリドマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、該ハイブリドマを常法に従って培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

【0030】更に、前記の方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー等の通常の精製手段を利用して高純度に精製することができる。

【0031】このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光抗体法(Immunofluorescence Analysis)等の通常の免疫学的手段により、抗原の新規膜タンパクを発現している慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜細胞を高感度且つ高精度をもって識別し、同定することを可能にするものである。

【0032】本発明の遺伝子は、ヒトブレB細胞増殖支持能を示す膜タンパクを発現する慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜細胞等からmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することにより得られる。このmRNAの供給源となる細胞としては、ハイブリドマRS38の免疫源として用いたSynSV6-14の細胞株等があげられるが、これらの細胞株に限らず、ブレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクを発現している細胞であればいずれのものでもよい。尚、本発明では、SynSV6-8を用いた。

【0033】mRNAを得るための全RNAの調製は、グアニジンチオシアネート処理後、塩化セシウム密度勾配遠心を行い[Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294(1979)]、全RNAを得る方法や、バナジウム複合体のリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う[Berger & Birkenmeier, Biochemistry, 18:5143(1979)]方法の他、公知の手段を用いることができる。

【0034】全RNAからのmRNAの調製は、オリゴ(dT)を結合した担体、例えば、セファロースやセルロース等を用いたアフィニティークロマトグラフィー法かバッチ法により全RNAからpoly(A)+RNAを回収することによってできる。また、ショ糖密度勾配遠心法等によりpoly(A)+RNAを更に精製することもできる。その他、いったんRNAを調製せずに、直接poly(A)+RNAを得る方法や市販のキットを用いた簡便な方法も使用することができる。

【0035】上記の如くして得たmRNAから二本鎖cDNAを得るには、例えば、mRNAを鋳型にして、3'末端にあるポリA-鎖に相補的なオリゴ(dT)をプライマーとして逆転写酵素で処理してmRNAに相補的なDNA(cDNA)を合成する。

【0036】mRNAをアルカリ処理により分解、除去した後、得られた一本鎖cDNAを鋳型にして逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼ(例えば、Klenow断片等)処理後、S1ヌクレアーゼなどで処理するか、直接RNaseH及びDNAポリメラーゼ等で処理することによっても二本鎖cDNAを得ることができる[Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982)、及びGubler & Hoffman, Gene, 25:263(1983)]。最近、簡便なキットも市販されており、これらを用いて二本鎖cDNAを得ることもできる。

【0037】このようにして得られたcDNAを適当なベクター、例えば、pBR322、pSC101等のE K型プラスミドベクターやλgt10等のファージベク

10

20

30

40

50

ター等に組み込んだ後、大腸菌(X1776, HB101, DH1, DH5など)等を形質転換してcDNAライブラリーを得ることができる(例えば、前出の“Molecular Cloning”を参照)。

【0038】一方、前述の方法で得た二本鎖cDNAを適当な発現ベクターに挿入することにより、他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。

【0039】二本鎖cDNAをベクターと連結させるには、適当な化学合成DNAアダプターを付加し、予じめ制限酵素を用いて開裂させたベクターDNAとATP存在下にT4ファージDNAリガーゼで処理することにより行うことができる。

【0040】本発明の発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、発現させようとする遺伝子の前に位置するプロモーター、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナル等を含んでいる。

【0041】哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス(SV)40等のウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 α (HEF-1 α)等の細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えば、SV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan等の方法[Nature, 277:108(1979)]に従えば、容易に実施することができる。

【0042】複製起源としては、SV40ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることができ、選択マーカーとしては、ホスホトランスフェラーゼAPH(3')IあるいはI(neo)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子等を用いることができる。

【0043】宿主細胞として原核細胞を用いて目的の遺伝子を形質発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起源及び調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。また、ベクターは、形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することができるマーカー遺伝子を持つものが望ましい。例えば、大腸菌の場合には、それを宿主とするベクターであるpBR322を用いて形質転換することができる[Boliver等:Gene, 2:95(1975)]。該pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、どちらかの耐性を利用することによって形質転換細胞を同定することができる。

【0044】原核宿主細胞の遺伝子発現に必要なプロモ

ーターとしては、 β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター[Chang等:Nature 275:615(1978)]や、ラクトースプロモーター[Goeddel等:Nature, 281:544(1979)]、及びトリプトファンプロモーター[Goeddel等:Nucleic Acid Res., 8:4057(1980)]、tacプロモーター等が好適なものとしてあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0045】本発明の発現系に用いる宿主のうち原核宿主細胞としては、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、バシラス・サーモフィルス(*Bacillus thermophilus*)等が好適なものとしてあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0046】また、真核宿主細胞としては、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等の真核微生物が好適なものとしてあげられるほか、COS細胞、チャイニーズハムター卵巣(CHO)細胞、C127細胞、3T3細胞、Hela細胞、BHK細胞、ナマルバ細胞、ヒト胎児腎細胞(293細胞)等の哺乳動物由来の細胞も好適に用いることができるが、これらに限定されるものではない。尚、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行えばよい。

【0047】本発明のブレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクをコードするcDNAを単離するには、例えば、ブレB細胞増殖支持能を指標とするか、抗体を用いた直接発現クローニング等の方法を用いて行うことができる。ブレB細胞増殖支持能の測定は、マウスブレB細胞株DW34[Eur. J. Immunol., 18:1767(1988)]を用いて実施することができる。すなわち、24穴プレートにブレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクを発現している細胞をサブコンフルエント(概ね50%密度が望ましい)になるまで培養し、適量の放射線を照射した後、1穴あたり1 \sim 2 \times 10³個のDW34を添加し、10%FCSを含むRPMI-1640培地中で5%CO₂の条件下、37℃で4 \sim 6日間程度培養する。各穴のDW34の生存細胞数をトリパンブルー染色で調べることによって増殖支持能の亢進の程度がわかる。

【0048】本発明では、慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜細胞上の新規膜タンパクを認識するモノクローナル抗体RS38を用いたFACSscanによるフローサイトメトリー(Flow Cytometry)により、膜タンパクを発現している形質転換体を選別し、その形質転換体の作製に用いたプラスミドDNAを細分化して再度形質転換体を作製し、その形質転換体をフローサイトメトリーによりスクリーニングすることをくり返すことによって、目的の遺伝子をクローニングすることができた。

【0049】具体的には、形質導入された形質転換体（293T細胞）を培養した後、0.02%のEDTAを含むPBSでプレートより剥がし、2%FCS、0.02%NaN₃を含むPBSからなるFACS緩衝液で細胞を洗浄した後、1次抗体としてRS38と反応させる。次いで、FACS緩衝液で洗浄して未反応の1次抗体を除去し、2次抗体のFITC標識抗体（FITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体）と更に反応させた後、ヨウ化プロビジウムによる染色で死亡細胞を識別し、生存細胞をFACSscanで解析することによって、RS38と強く反応する形質転換体を選別した。

【0050】更に、抗体と反応した形質転換体の作製に用いたcDNAを含む大腸菌（DH5）をアルカリ処理して目的遺伝子を含むプラスミド群を選別し、これらのプラスミド群を更に幾つかのプラスミド群に小分けして、再度、293T細胞に形質導入させた後、前述のモノクローナル抗体RS38を用いたFACSscan解析による形質転換体の選択をくり返すことにより、配列表の配列番号2に示される新規なブレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクポリペプチドをコードする完全長cDNA（pRS38-BOS）を得ることができた。

【0051】尚、このcDNAをpUC19ベクターのXbaI切断部位間に挿入したpRS38-pUC19を含有する大腸菌（E. coli）DH5α株は、平成5年（1993年）10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、Escherichia Coli DH5α（pRS38-pUC19）、受託番号FERM BP-4434としてブダベスト条約に従って国際寄託されている。

【0052】一般に、真核生物の遺伝子は、ヒトインターフェロン遺伝子等で知られているように、多形現象を示すと考えられ〔例えば、Nishi等、J. Biochem., 97:153（1985）〕、この多形現象によって1個又はそれ以上のアミノ酸が置換されている場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

【0053】また、配列表の配列番号1のアミノ酸配列の中の1個又はそれ以上のアミノ酸を欠くか又は付加したポリペプチドあるいはアミノ酸が1個もしくはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも本発明の新規膜タンパクと同じ機能（ブレB細胞増殖支持能）を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン-2（IL-2）遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知となっている〔Wang等、Science, 224:1431（1984）〕。

【0054】更には、既知タンパクの遺伝子と配列表の配列番号2の遺伝子を適当な制限酵素又はアダプター等を用いて連結させて、既知タンパクと結合したポリペ

チドとして産生させることもできる。既知タンパクの遺伝子としては、例えば、免疫グロブリンがあげられ、その可変領域部分の代わりに配列表の配列番号2に示される遺伝子を用いて、Fc部分と結合させればよい〔Zettlmeissl等、DNA AND CELL BIOLOGY, 9:347-353（1990）〕。

【0055】また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加されるが、アミノ酸を1ないしそれ以上交換することにより糖鎖付加を調節することができる。この場合も本発明の新規膜タンパクポリペプチドと同じ機能を有することがある。従って、前記の如き種々の方法により本発明における膜タンパクポリペプチドをコードする遺伝子を人工的に改変したもので、得られたポリペプチドが本発明の膜タンパクポリペプチドと同じ機能を有する限り、それらの遺伝子及びポリペプチドは全て本発明に含まれることは云うまでもない。

【0056】更に、配列表の配列番号2に示される遺伝子とハイブリダイズする遺伝子も、その遺伝子から発現されるポリペプチドが本発明の膜タンパクポリペプチドと同じ機能（ブレB細胞増殖支持能）を有する限り、それらの遺伝子及びポリペプチドは全て本発明に含まれることは云うまでもない。この場合、ハイブリダイゼーションは、通常のハイブリダイゼーションの条件（例えば、前述の“Molecular Cloning”を参照）を用いて行うことができる。

【0057】目的とするブレB細胞増殖支持能を有する膜タンパクポリペプチドを製造するには、該ポリペプチドをコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したポリペプチドを適当な可溶化剤で可溶化した後、分離、精製することによって、均一な可溶性の膜タンパクポリペプチドを得ることができる。尚、可溶化剤としては、例えば、Nonidet P-40（NP-40）、Sodium Dodecyl Sulphate（SDS）、Triton X-100、Tween 20等が好適なものとしてあげられる。

【0058】また、可溶性の膜タンパクは、遺伝子工学的に製造することもできる。すなわち、図3に示されるごとく、RS38は、N末端側に細胞膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを持つ細胞膜貫通型蛋白質であると予想されることから、配列表の配列番号1の49番目のAsnをN末端とする可溶性RS38をPCR-変異誘発法〔M. Kamman等、Nucl. Acids Res., 15:5404（1989）〕を用いて製造することができる。その場合、シグナル配列としては、公知のものをいれればよく、例えば、Bst-1（特願平5-141178号）及びG-CSF（特公平2-5395号）のシグナル配列などがあげられる。

【0059】該膜タンパクポリペプチドの分離、精製の手段としては、通常の蛋白質で用いられる方法を適用すればよく、例えば、前述のモノクローナル抗体を用いた

アフィニティークロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー、限外ろ過、塩析、透析等を適宜選択、組合わせて通常の方法に準じて分離、精製すれば、本発明の膜タンパクのポリペプチドを分離、精製することができる。

【0060】

【実施例】以下、参考例及び実施例によって本発明を詳細に説明するが、この実施例によって本発明は何ら限定されるものではない。

【0061】参考例1

健康人由来ストローマ細胞株の樹立

健康人のストローマ細胞にSV40のLarge T抗原cDNAとニワトリβ-アクチンプロモーターを含むpAct-SVTプラスミド〔BBRC 186:129-134 (1992)〕を、Gene Pulser (BioLad製)を用いてエレクトロポレーションした。すなわち、PBS中の健康人のストローマ細胞 1×10^7 細胞/mlの0.8mlアリコートと10μgのプラスミドを混合し、10分間氷中でインキュベートした後、250V、250μF静電容量の条件でエレクトロポレーションを行い、更に、10分間氷中でインキュベートした後、10%FCS (Bioproducts製)を含むRPMI-1640培地 (GIBCO製)に懸濁し、10cm培養皿にて培養した。培養液の交換は3日おきに行い、約2週間後に生育のよい付着細胞のコロニーをトリプシンを染み込ませた小片のろ紙にて取りだし、健康人の骨髓由来ストローマ細胞株 (NFSV1-1)を得た〔J. Immunol., 149:4088 (1992)〕。

【0062】参考例2

慢性関節リウマチ (RA) 患者由来滑膜細胞株の樹立

慢性関節リウマチ (RA) 由来の滑膜細胞にSV40のLarge T抗原cDNAとニワトリβ-アクチンプロモーターを含むpAct-SVTプラスミド〔BBRC, 186:129-134 (1992)〕を、Gene Pulser (BioLad製)を用いてエレクトロポレーションした。すなわち、PBS中のRA患者由来の滑膜細胞 1×10^7 細胞/mlの0.8mlアリコートと10μgのプラスミドを混合し、10分間氷中でインキュベートした後、250V、250μF静電容量の条件でエレクトロポレーションを行い、更に、10分間氷中でインキュベートした後、10%FCS (Bioproducts製)を含むRPMI-1640培地 (GIBCO製)に懸濁し、10cm培養皿にて培養した。培養液の交換は3日おきに行い、約2週間後に生育のよい付着細胞のコロニーをトリプシンを染み込ませた小片のろ紙にて取りだし、慢性関節リウマチ (RA) 患者由来滑膜細胞株 (SynSV6-8及びSynSV6-14)を得た。

【0063】実施例1

モノクローナル抗体の作製

1) 感作抗原と免疫法

感作抗原として、上記参考例2で得たブレB細胞増殖支持能を有する慢性関節リウマチ (RA) 患者由来滑膜細胞株SynSV6-14を用いて抗原感作を行った。細胞株は、10%牛胎児血清 (FCS、Bioproducts製)、及び50μM 2-メルカプトエタノール含有RPMI-1640 (GIBCO製)を培地として使用し、5%CO₂ インキュベーター中で37℃の温度条件下で継代培養を行った。

10

【0064】細胞は、0.02%EDTA、PBS処理後、軽いピペッティングによってインキュベーターの培養フラスコより回収した。この細胞を約 1×10^7 個/mlの細胞数でRPMI-1640培地に懸濁し、浮遊させ、BALB/C系マウス (4週令、♀、日本エスエルシー社製)に免疫した。初回免疫には、約 1×10^7 個/mlの細胞をマウス腹腔内に注射し、2~3週後に 1×10^7 個/mlの細胞を追加免疫した。更に、2~3週間隔にて 1×10^7 個/mlの細胞を2~3回追加免疫し、最終免疫3日後にマウスを屠殺して脾臓を摘出した。

20

【0065】2) 細胞融合

1匹のマウスから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、RPMI-1640培地 (GIBCO製)中に懸濁し、浮遊させ、充分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株P3X63Ag8.653〔J. Immunol., 123:1548 (1979)〕を、10%牛胎児血清 (FCS、FILTRON製)を含有するDMEM (GIBCO製)培地にて培養して得た細胞を、同様に前記DMEM培地で洗浄後、その 1×10^7 個と、前記脾細胞 1×10^8 個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール1500 (Boehringer製)によって常法〔Clin. Exp. Immunol., 42:458-462 (1980)〕に従い細胞融合させた。

30

【0066】得られた融合細胞を、10%FCSを含むDMEM培地にて96個のウエルプレートに分注し、5%CO₂ インキュベーター中で37℃で培養した。翌日よりHAT選択培地 (1.0×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} Mアミノプテリン、 1.6×10^{-5} Mチミジンを含む完全RPMI-1640培地に、10%FCS及び50μM 2-メルカプトエタノールを加えた培地)に徐々に置換させて培養を続けた。培養開始後、上清の半分を週2回の頻度、それぞれ新しいHAT培地に代え、培養を継続し、増殖維持させた。

40

【0067】このようにして得られた融合細胞を限界希釈法を用いてクローニングした。すなわち、前記融合細胞の培養上清中の抗体を利用して、感作抗原との結合性を調べ、感作抗原と強い結合性を有するクローンだけを常法により限界希釈法を用いてクローンを形成させた。

50

【0068】クローンの形成は、前記ハイブリドーマ及びBALB/C系マウス脾細胞を所定量含むように調整し、ハイブリドーマ1~10個/ウェルとなるように96ウェルのプレートに播いて、5%CO₂ インキュベーター中で37℃にて培養した。増殖してくるハイブリドーマを同様にクローニングする操作を、通常の限界希釈法に従って、理論上単一のクローンとなるまで繰り返した。目的の抗体を産生するクローンは、前記感作抗原を用いてスクリーニングを行った。

【0069】3) スクリーニング

融合細胞(ハイブリドーマ)のスクリーニングは、フローサイトメーター(Flow Cytometer)を使った間接蛍光抗体法により行った。目的の抗体を産生するクローンのスクリーニングは、ターゲット細胞として、

a) SynSV6-14(感作抗原)、b) 正常ヒト骨髓由来ストローマ細胞株NFSV1-1、等を用いて行った。すなわち、ブレB細胞増殖支持能を有する慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜由来細胞株(SynSV6-14)をBALB/C系マウスに免疫することにより、SynSV6-14と反応するがブレB細胞増殖支持能を持たない正常ヒト骨髓由来ストローマ細胞株(NFSV1-1)とは反応しないことを指標としてモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。最初のスクリーニングは、反応細胞として感作抗原であるSynSV6-14を用いて行った。まず、SynSV6-14に反応する融合細胞クローンを選ぶために、該SynSV6-14に反応する培養上清を選別し、1次スクリーニングを行った。

【0070】すなわち、細胞を反応バッファー〔2%FCS、0.02%NaN₃を含むPBS〕に懸濁し、ハイブリドーマ培養上清20μl中に浮遊させ(約5×10³個/20μl)、4℃にて20分間反応させた。前記バッファーにより2回洗浄した後、FITC標識ヤギ抗マウスIg抗体(Cappel製)を加えて20分間インキュベーションした。3回洗浄した後、フローサイトメーター(Flow Cytometer)(FACScan、Becton Dickinson製)にて解析した。

【0071】次に、反応細胞として正常ヒト骨髓由来ストローマ細胞株NFSV1-1を用い、前記の如くフローサイトメーター(Flow Cytometer)により解析した。これによって、SynSV6-14により強く反応する抗体を産生しているハイブリドーマを得た。

【0072】このようにして、SynSV6-14とは反応するが、正常ヒト骨髓由来ストローマ細胞株NFSV1-1とは反応しない抗体を産生するハイブリドーマ(RS38)を分離した。このハイブリドーマが産生する抗体は、IgM、κ型であった。

【0073】尚、上記のモノクローナル抗体RS38を産生する当該ハイブリドーマは、BALB/C系マウス脾細胞とマウス・ミエローマP3X63Ag8.653を親細胞として作製された新規な融合細胞であり、平成5年(1993年)10月5日付で公的微生物寄託機関である工業技術院生命工学工業技術研究所に、Mouse-Mouse hybridoma RS38、受託番号FERM BP-4433としてブダベスト条約に従って国際寄託されている。

10 【0074】4) 抗体の精製

前記2)で作製した融合細胞を常法に従って培養し、培養上清中に産生される抗体を常法により分離し、精製した。すなわち、各ウェルのうち前記感作抗原に対する抗体価の最も高かったウェルからハイブリドーマを採取し、細胞の増殖が認められたウェルのうち1つを取り、得られた培養細胞を5%CO₂ 組織培養フラスコに広げて37℃にて継代培養を行い、増殖させた。得られた細胞をプリスタン投与を施行したBALB/C系マウス(6週令、♀、日本エスエルシー社製)に腹腔内注入した。10~14日後、産生された腹水を採取し、50%硫酸アンモニウムで塩析し、PBSで透析後、QAEカラムにて精製を行った。抗体は、更に塩析し、十分に透析を行い約6mg/mlの精製品を得た。

【0075】実施例2

モノクローナル抗体の性質

1) 細胞株の分布

種々の細胞株(表1に示す各種セルライン)におけるRS38抗原の分布をFACScanを用いて解析した。すなわち、種々の細胞株を、1次抗体として実施例1で得られたマウスモノクローナル抗体RS38、10μg/ml存在下で2%FCS、0.02%NaN₃を含むPBSからなるFACS緩衝液に懸濁し、20分間氷中でインキュベートした。FACS緩衝液にて2回洗浄後、2次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウスIg抗体(Cappel製)を使用し、更に15分間氷中でインキュベートした。ヨウ化プロビジウム(Propidium iodide, PI)を最終濃度1μg/mlとなるように加え、更に5分間氷中でインキュベートした。FACS緩衝液にて3回洗浄後、前方散乱光にて細胞の生死を識別し、生細胞のみをFACScan(Becton Dickinson製)にて解析した。尚、対象として、マウスモノクローナル抗体SG2及びRF3(特願平5-141178号)を使用した。その結果を表1に示す。表1から明らかな如く、RS38抗原の分布は、SG2及びRF3と異なるものであることがわかった。

【0076】

【表1】

Origen	Cell Line	SG2/RF3	RS38
T cell line	MOLT-4	-	+/-
	JURKAT	+	-
B cell line	Raji	-	-
	Paudi	-	-
	CL4	-	++
	Ramos	-	-
Myeloid	U937	+	+
	K562	-	+
	HL60	-	+/-
	M07	-	+
Miscellaneous	HepG2	-	+/-
	T24	-	+/-
	SKWG-4(P122)	-	+/-
	HeLa	-	+/-

【0077】実施例3

1. cDNAライブラリーの作製

1) poly (A) + RNAの調製

慢性関節リウマチ (RA) 患者由来滑膜細胞株 SynSV6-8 細胞からの Poly (A) + RNA の調製は、Fast Track™ mRNA ISOLATION KIT version 3.2 (Invitrogen 製) を用いて実施した。すなわち、10 cm 培養皿 20 枚分の SynSV6-8 細胞をホモジネートし、キット添付の処方に従って全 RNA を調製した。更に、キット付属のオリゴ d (T) セルロースを用いて、キット添付の処方に従って poly (A) + RNA を精製した。

【0078】2) cDNAライブラリーの構築

上記 poly (A) + RNA 5 μg を材料として cDNA 合成キット TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 製) を用いてキット添付の処方に従って二本鎖 cDNA を合成し、BstXI アダプター (Invitrogen 製) を DNA ligation kit (宝酒造社製) を用いてキット添付の処方に従って連結した。遊離の BstXI アダプターの除去はキット付属の Size Sep 400 Spin Column を用いてキット添付の処方に従って行い、アダプター付加 2 本鎖 cDNA 約 100 μl を得た。

【0079】このようにして作製したアダプター付加 2 本鎖 cDNA 約 100 μl のうち 1 回の Ligation 反応には 2 μl を使用し、予じめ制限酵素 BstXI 及びアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) 処理した

pEF-BOS ベクター [Nuc. Acid Res., 18:5322 (1990)] と DNA ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、cDNA ライブラリーを構築した。構築した cDNA ライブラリーは、大腸菌細胞株 DH5 (トーヨーボー社製) に形質導入され、全体のサイズは約 2×10^5 の独立したクローンであると推定された。形質導入した大腸菌 2,000 ~ 4,000 クローンからなるプールを 50 プール作製し、以下の実験に用いた。

10 【0080】2. 直接発現法によるクローニング

1) 293 T 細胞へのトランスフェクション

上記のプールした大腸菌を 50 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 氏, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] にて培養することにより cDNA の増幅を行い、アルカリ法 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 氏, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] により大腸菌からプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミド DNA は、塩化セシウム/臭化エチジウム密度勾配による超速心 を 2 回繰り返すことにより精製度を高め、リン酸カルシウム法により 293 T 細胞 [293 細胞 (Transformed primary embryonal kidney, human ATCC CRL1573) に SV40 Large T 抗原 cDNA を導入した細胞株] にトランスフェクションした。

30 【0081】すなわち、精製したプラスミド DNA 2 μg を 1 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA を含む 100 μl の緩衝液に溶解し、14 μl の 2 M CaCl₂ を添加した後、50 mM HEPES (pH 7.1)、280 mM NaCl、1.5 mM Sodium Phosphate からなる緩衝液に徐々に混合し、室温にて 30 分間インキュベートし、24 穴プレート中の 293 T 細胞に添加した。293 T 細胞は、10% 牛胎児血清 (PCS: Bioproducts 製) を含む DMEM (GIBCO 製) 培地にて、37°C、5% CO₂ の条件下で 2 日間培養した。

【0082】2) FACSscan による解析

形質導入した 293 T 細胞は、0.02% の EDTA を含む PBS にて 24 穴プレートより剥がし、2% FCS、0.02% N₂ を含む PBS からなる FACS 緩衝液にて 2 回細胞を洗浄した後、1 次抗体として 10 μg/ml の前記モノクローナル抗体 RS38 存在下で 20 μl の FACS 緩衝液に懸濁し、20 分間氷中でインキュベートした。FACS 緩衝液にて 2 回洗浄後、2 次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel 製) を使用し、更に 15 分間氷中でインキュベ

ートした。ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide, PI) を最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、更に5分間氷中でインキュベートした後、FACS緩衝液にて3回洗浄後、前方散乱光にて細胞の生死を識別した後、生細胞のみをFACSscan (Becton Dickinson製) にて解析した。

【0083】3) cDNAライブラリーのクローニング
2,000~4,000クローンの大腸菌をひとつのプールとしてアルカリ法にて回収されたプラスミドDNAを前述の方法に従って293T細胞にトランスフェクションし、上記FACS解析によるスクリーニングを行った。25番目のプールを発現させた293T細胞に、マウスモノクローナル抗体RS38により強く染色されるピークを認めた。本プラスミドDNAのプールを再び大腸菌DH5 (GIBCO BRL製) に形質導入し、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLBアガープレートに接種した。

【0084】コロニーを形成した約2,000個のクローンをプレート底面に網目状に区分を入れ、接種したクローンの位置がわかるようにしたアガープレートに100クローン/プレートとなるように一つずつ接種し、同じものを2つ作製した。100個のクローンを一つのプールとして20プール作製し、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB培地で大腸菌を培養した。アルカリ法にてプラスミドDNAを回収後、293T細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションして前述と同様にFACSscan解析を行った。FACSscan解析の結果、陽性と認められた一つのプールから大腸菌100クローンを一つずつ単離してそれぞれのクローンを培養し、アルカリ法にてプラスミドDNAを回収した。各プラスミドDNAを293T細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションして前述と同様にFACSscan解析を行い、単一の陽性クローンを得て、pRS38-BOSと命名した。

【0085】本クローンについて、Auto Read sequencing kit (Pharmacia製) 及びAuto Cycle sequencing kit (Pharmacia製) を用いて、キット添付の処方に従いシーケンス反応を行い、A. L. F. TM DNAシーケンサー (Pharmacia製) にて塩基配列の決定を行った。その結果、最長のOpen Reading Frameより180アミノ酸残基をコードすると推定される全長996bp (配列表の配列番号2) の遺伝子であり、遺伝子解析ソフトGeneTexを用いてデータベースSWISS PLOT、及びNBRFによるホモロジー検索を行った結果、新規の遺伝子であった。

【0086】4) Northern Blotting analysisによる発現検討

RA患者由来滑膜細胞株SynSV6-14、RA患者

由来骨髄間質細胞株RASV5-5、及び正常ヒト由来骨髄間質細胞株NFSV1-1よりFastTrack TM mRNA ISOLATION KIT version 3.2 (Invitrogen製) を用いてPoly(A)+RNAを調製し、Northern Blotting analysis (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を行った。すなわち、10cm培養皿10枚で培養したそれぞれの細胞株を回収し、ホモジネート後、キット添付の処方に従って全RNAを調製した。更に、キット付属のオリゴd(T)セルロースを用いて、キット添付の処方に従ってPoly(A)+RNAを精製した。

【0087】プローブの標識は、Multiprime DNA labelling system (Amersham製) を用いて行った。すなわち、pEF-BOSのBstXI部位に挿入されたRS38をコーディングすると考えられるインサートを制限酵素HindIIIにより消化させて315bpの断片を調製し、キット添付の処方に従って標識プローブを作製した。SynSV6-14、RASV5-5、及びNFSV1-1より調製したPoly(A)+RNAを1レーンあたり3 μg 使用し、アガロースゲル電気泳動を行った後、Hybridization Transfer MembraneとしてGene Screen Plus TM (DUPONT製) を使用し、キャピラリー法によりブロッティングした。ハイブリダイゼーションは、0.5M NaPO₄、1mM EDTA、7% SDS、1% BSA、pH7.0の組成よりなるGilbert & Church bufferを用いて65℃で一晩実施した。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを2×SSCで室温にて4回洗浄し、更に0.1×SSC、0.1% SDSにて55℃で2回洗浄した後、X線フィルムと重ねあわせて一晩オートラジオグラフィーを行った。その結果、図1に示すようにSynSV6-14に約1.0kbの明瞭なバンドが検出された。

【0088】3. BALB3T3細胞による発現
新規分子をBALB3T3細胞に導入し動物細胞での発現を検討した。すなわち、20 μg のpRS38-BOSと2 μg のネオマイシン耐性遺伝子を含むpSV2neo [P. J. Souethem and P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1:327 (1982)] を 1×10^7 細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、10分間氷中でインキュベートした後、Gene Pulser (BioLad製) を用いて、250V、250 μF の静電容量の条件にてトランスフェクションを行い、同時形質転導入した。

【0089】更に、10分間氷中でインキュベートした

後、細胞を2mg/mlのG418及び10%FCS (Bioproducts製)を含むDMEM培地(GIBCO製)に懸濁し、24穴プレートにて培養した。培養液の交換は3日おきに行い、約2週間後に生育のよいネオマイシン耐性付着細胞の単一のコロニーを形成している穴より、前記マウスモノクローナル抗体RS38と反応する形質転換細胞株BALB3T3 38-1、38-3及び38-9を得た。また、対照細胞として、RS38と反応しないがネオマイシン耐性である形質転換細胞株BALB3T3 38-4を得た。

【0090】4. 新規分子の生物学的性質

1) マウスブレB細胞株の増殖支持

新規分子の生物学的性質は、ストローマ細胞依存性に増殖するマウスブレB細胞株DW34を用いて、増殖細胞数を指標として以下に示す方法にて解析した。まず、24穴プレートに形質導入細胞株BALB3T3 38-1、38-3及び38-9ならびに対照細胞株BALB3T3及びBALB3T3 38-4をサブコンフルエントになるまで培養し、30Gyの放射線を照射後、1穴あたり 2×10^3 個のDW34を添加し、10%FCS (Bioproducts製)を含むRPMI-1640 (GIBCO製)培地中で、37℃、5%CO₂の条件で4日間培養した。各穴のDW34の生細胞数をトリパンブルー染色にて算定し、増殖支持能を解析した。その結果、図2に示す如く、形質導入細胞株BALB3T3 38-1、38-3及び38-9において、対照細胞株BALB3T3及びBALB3T3 38-4と比べて、DW34の増殖が促進された。

【0091】5. 新規分子の物理化学的性質

1) N末端の解析

DNA解析ソフトGene Worksを用いて、前記*

配列

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
      5              10              15
Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
      20              25              30
Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
      35              40              45
Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
      50              55              60
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
      65              70              75              80
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
      85              90              95
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
      100             105             110
Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
      115             120             125
Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
      130             135             140

```

*のようにして得られた遺伝子の、疎水性領域と親水性領域の解析を行った。解析した結果を図3に示す。その結果、配列表の配列番号1の21番目に示されるアミノ酸Lysから48番目のアミノ酸Alaにいたる28個のアミノ酸残基からなる領域が最も疎水性が高く、成熟蛋白質のN末端側に細胞膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを持つ細胞膜貫通型蛋白質であると予想された。

【0092】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明は、ブレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターによる形質転換体、及び該遺伝子を用いたブレB細胞増殖支持能を有する新規膜タンパクの製造方法に関するものであり、本発明の遺伝子は、慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜細胞上の膜タンパクをコードする。

【0093】本発明の遺伝子を適当なベクターに挿入した後、常用の宿主細胞を形質転換することにより、大量に均一な新規膜タンパクポリペプチドを製造することが可能であり、更には、慢性関節リウマチ(RA)患者由来滑膜細胞を感作抗原として使用して、当該膜タンパクポリペプチドを認識するモノクローナル抗体を製造することが可能であり、このことから、本発明により慢性関節リウマチ(RA)の同定及びこれらの臨床上の診断用試薬の作製が可能である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：180

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：ペプチド

21
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
 165 170 175
 Ala Leu Leu Gln

22

配列番号：2
 配列の長さ：996
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖

*トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA to mRNA
 特徴を決定した方法：E

*

配列

GTGGAATTC ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC AGA GTG CCC ATG GAA 51
 GAC GCG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GCG ATA GGA ATT CTG GTG 99
 CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG ATT ATC TTC ACC ATC 147
 AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CCG GAC GGC CTT CCG GCA GTG ATG GAG 195
 TGT CCC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG CTG ACC GAG GCC CAG 243
 AAG GCC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC ACC TGC AAC CAC ACT 291
 GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG AAG GCC CAA GGA CAA 339
 AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT ACA TTA AAC CAT AAG 387
 CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG AGA AGA GAA AAC CAG 435
 GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC TAC CCC AGC TCC CAG 483
 GAC TCC AGC TCC GCT CCG GCG CCC CAG CTG CTG ATT GTG CTG CTG GGC 531
 CTC ACC GCT CTG CTG CAG TGAGATCCCA GGAAGCTGGC ACATCTTGA AGTCCGTCC 589
 TGCTCCGCTT TTCGCTTGAA CATTCCTTG ATCTCATCAG TTCTGAGCGG GTCATGGGCG 649
 AACACCGTTA GCGGGGAGAG CACGGGTAG CCGGAGAAGG GCCTCTGGAG CAGGTCTGGA 709
 GGGGCCATGG GGCAGTCTGT GGTGTGGGA CACAGTCCGG TTGACCCAGG GCTGTCTCCC 769
 TCCAGAGCCT CCCTCCGAC AATGAGTCCC CCCTCTTGTC TCCCACCTG AGATTGGGCA 829
 TGGGTGCGG TGTGGGGGC ATGTGCTGCC TGTGTGTATG GGTTTTTTT CCGGGGGGGG 889
 TTGCTTTTTT CTGGGTCTT TGAGCTCAA AAAATAAACA CTTCCTTTGA GCGAGAGCAA 949
 AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAGAATTC CACCACA 996

【図面の簡単な説明】

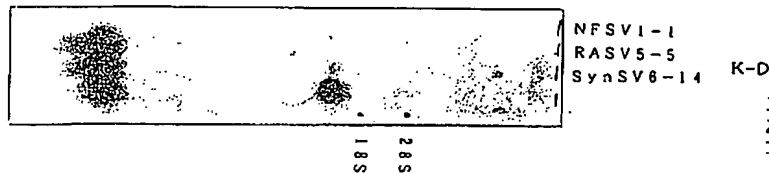
【図1】本発明の実施例で得られた遺伝子のNorthern Blotting analysisによる解析結果（アガロースゲル電気泳動写真図）を示す。

【図2】本発明の実施例で得られた膜タンパクのマウス※

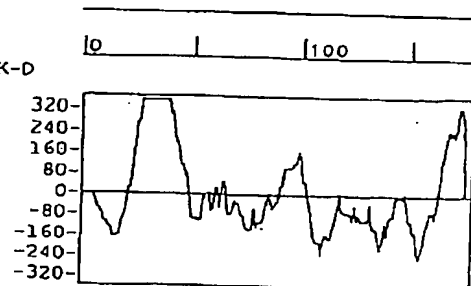
30※ブレB細胞株DW34の増殖支持能を示す。

【図3】本発明の実施例で得られた遺伝子の疎水性領域と親水性領域をDNA解析ソフトGene Worksを用いて解析した結果を示す。

【図1】

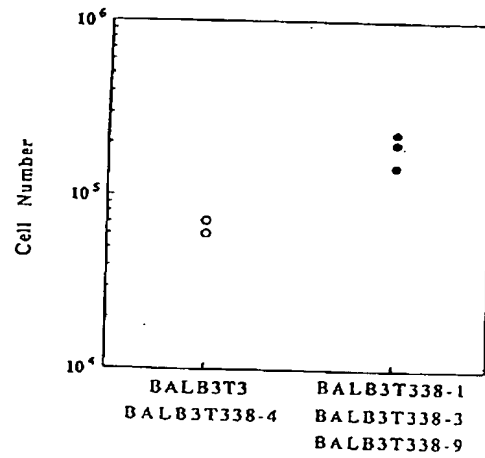


【図3】



Amino acid number

【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/02	Z N A	C 9282-4B		
15/09				
C 1 2 P 21/02				
21/08				
G 0 1 N 33/53	D	9161-4B		
33/577				
// A 6 1 K 39/395				
(C 1 2 P 21/02	U			
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
		9281-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A